

2008J7003A

2008J7003B

薬剤耐性食中毒菌サーベイランスに関する研究

(課題番号：H18-食品-一般-003)

平成 20 年度総括・分担研究報告書
及び

平成 18～20 年度総合研究報告書

(厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業)

研究代表者 渡辺 治雄

国立感染症研究所 細菌第一部

平成 21(2009)年 4 月

目次

厚生労働科学研究費補助金食品の安心・安全確保推進研究事業

1. 平成20年度総括研究報告書

薬剤耐性食中毒菌サーベイランスに関する研究…………… 1

研究代表者 渡辺 治雄 国立感染症研究所

2. 平成20年度分担研究報告書

(I) サルモネラをはじめとした食中毒菌の薬剤耐性に関する遺伝学的研究…………… 11

研究分担者 泉谷 秀昌 国立感染症研究所

研究協力者 寺嶋 淳 国立感染症研究所

松本 裕子 横浜市衛生研究所

(II) 食品・ヒト由来食中毒細菌の薬剤耐性の疫学的研究…………… 19

研究分担者 山口 正則 埼玉県衛生研究所

研究協力者 倉園 貴至 埼玉県衛生研究所

大塚佳代子 埼玉県衛生研究所

上野 裕之 さいたま市健康科学研究センター

(III) ヒト由来腸内細菌の薬剤耐性に関する疫学的研究…………… 29

研究分担者 甲斐 明美 東京都健康安全研究センター

研究協力者 金子 誠二 東京都健康安全研究センター

横山 敬子 東京都健康安全研究センター

小西 典子 東京都健康安全研究センター

(IV) 食中毒菌の薬剤耐性獲得のリスクマネージメントに関する研究…………… 38

研究分担者 五十君静信 国立医薬品食品衛生研究所

浅井 鉄夫 農林水産省動物医薬品検査所

田口 真澄 大阪府立公衆衛生研究所

甲斐 明美 東京都健康安全研究センター

研究協力者 岡田由美子 国立医薬品食品衛生研究所

入口 翔一 国立医薬品食品衛生研究所

石和 玲子 国立医薬品食品衛生研究所

横山 敬子 東京都健康安全研究センター

西本 清仁 大分県食肉衛生検査所

(V) 家畜由来腸内細菌の疫学的研究			52
研究分担者	浅井 鉄夫	農林水産省動物医薬品検査所	
研究協力者	荻野 智絵	農林水産省動物医薬品検査所	
	小澤真名緒	農林水産省動物医薬品検査所	
(VI) 家畜由来腸内細菌の薬剤耐性化機構の解析			62
研究分担者	秋庭 正人	農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所	
研究協力者	楠本 正博	農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所	
	岩田 剛敏	農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所	
	片岡 康	日本獣医生命科学大学獣医微生物学教室	
(VII) 食品汚染腸内細菌の薬剤耐性疫学			72
研究分担者	田口 真澄	大阪府立公衆衛生研究所	
研究協力者	勢戸 和子	大阪府立公衆衛生研究所	
	河原 隆二	大阪府立公衆衛生研究所	
	井上 清	大阪府立公衆衛生研究所	
	山形 晃明	関西空港検疫所	
	鎌倉 和政	関西空港検疫所	
	柏樹 悦郎	関西空港検疫所	
(VIII) 犬および人由来フルオロキノロン耐性大腸菌の性状比較			84
研究分担者	田村 豊	酪農学園大学獣医学部獣医公衆衛生学教室	
研究協力者	石原加奈子	酪農学園大学獣医学部獣医公衆衛生学教室	
3. 研究発表一覧			93

薬剤耐性食中毒菌サーベイランスに関する研究

研究代表者： 渡邊治雄 国立感染症研究所副所長

研究要旨：生産から流通・消費にわたる幅広い視点で食中毒性細菌の薬剤耐性を把握するサーベイランス体制の確立を目指す研究を遂行してきた。家畜、食肉・食材、および患者から分離されるサルモネラ、カンピロバクター、大腸菌の各薬剤に対する耐性菌の動向および愛玩動物から分離される耐性菌の調査を行った。特に医療上重要なフルオロキノロン、第3、4世代セファロスポリン剤に対する耐性に焦点を当てた。その結果、病畜由来サルモネラから、7.6%にセファロスポリン耐性、0.6%にフルオロキノロン耐性が認められた。鶏肉分離のサルモネラでは、国内産鶏肉由来でセファロスポリン耐性が12.1%にあり、その内訳は、ESBL産生株が*S. Infantis* 6株(耐性遺伝子型 CTX-M-2、CTX-M-14、TEM-52、SHV-5-2a)、*S. Manhattan* 1株(TEM-52) および*S. Typhimurium* 1株(CTX-M-2)、また AmpC 型β-ラクタマーゼ産生株が7株、すべて*S. Infantis* (CMY-2)であった。埼玉県内で2008年に、散発下痢症患者等から分離されたサルモネラは、32血清型に型別され、最も多く分離されたのは、*S. Typhimurium*、*S. Enteritidis*、*S. Saintpaul*の順であった。このうち38.4%が12薬剤のいずれかに耐性を示した。最も多く分離された*S. Typhimurium*では52.6%が耐性を示し、1株はフルオロキノロン耐性および第3世代セフェム系薬剤であるCTX耐性株(*bla* CTX-M-14と*bla* TEM-1遺伝子を持つESBL産生菌)が1株分離された。家畜、鶏肉等のカンピロバクターの調査ではERFXに対する耐性率は、平成18、19年に*C. jejuni* (37.5%、25.8%)及び*C. coli* (30.2%、53.8%)でそれぞれ認められた。人のカンピロバクター症の第一次選択薬であるEMに対する耐性は、*C. coli*の約30%で認められたが、*C. jejuni*には全く認められなかった。市販食肉および食中毒関連食品中のMRSA汚染を調べた結果、1%前後に分離が見られたが、人から分離される菌との明らかな相関は現在のところ認められていない。愛玩動物、特に犬におけるフルオロキノロン耐性大腸菌の保菌状況を調査したところ、17.0%から耐性菌が分離され、蔓延していることが明らかとなった。しかし、現在のところ犬由来耐性菌が人へ伝播している証拠は見出されていない。上記のように動物、人から分離される食中毒菌の耐性率はかなりの頻度で認められる。今後の動向を追跡することが重要である。

研究分担者：	五十君静信	国立医薬品食品衛生研究所
秋庭正人	農業・食品産業技術総合研 究機構 動物衛生研究所	泉谷秀昌 国立感染症研究所 甲斐明美 東京都健康安全研究 センター
浅井鉄夫	農林水産省動物医薬品 検査所	田口真澄 大阪府立公衆衛生研究所

田村 豊 酪農学園大学獣医学部獣医
公衆衛生学教室
山口正則 埼玉県衛生研究所

A. 研究目的

サルモネラ、カンピロバクターは食中毒の原因菌の主たるものである。それらの菌の多剤耐性化、特にニューキノロン（フルオロキノロン）系抗菌薬を含む多剤に対する耐性化が問題となっている。それら耐性菌により感染した小児らで治療が困難を呈した例が報告されている。耐性化は、家畜等への過度の抗菌薬の使用が原因となっていると推測されており、食中毒菌の耐性化による健康人への健康危害の拡大が危惧されている。その被害を科学的に判断するためには、家畜への抗菌薬の使用、家畜における耐性菌の出現、食品の生産・流通段階における汚染菌の耐性状況、および消費された場合の患者における耐性菌の分離状況に関するデータの蓄積が要求される。それを推進するため、本研究においては、家畜飼育現場（農林省関連機関：動物医薬品検査所および動物衛生研究所）、食品取り扱い現場（国立医薬品食品衛生研究所）、医療現場にかかわる機関（国立感染症研究所、地方衛生研究所）、ペット等の愛玩動物の調査（酪農学園大学）の連携による、実態調査に基づく食中毒関連細菌の耐性状況の経時的サーベイランス体制の構築、耐性菌の伝播状況の科学的解析を行う。それにより、家畜等に使用された抗菌薬の結果出現した耐性菌がヒトの健康にどのような影響を及ぼしているのかを推測するデータを蓄積する。

B. 研究方法

- 1) 薬剤感受性試験：BBL 社のセンシディスクを用いて、NCCLS に準拠した方法により試験し耐性を決定した。使用した薬剤はゲンタマイシン (GM)、カナマイシン (KM)、ストレプトマイシン (SM)、テトラサイクリン (TC)、クロラムフェニコール (CP)、ST 合剤 (SXT)、ナリジクス酸 (NA)、シプロフロキサシン (CPFX)、オフロキサシン (OFLX)、ホスホマイシン (FOM)、ノルフロキサシン (NFLX)、スルフィソキサゾール (Su)、アンピシリン (AMP)、セファゾリン (CFZ)、セフトキシム (CTX)、セフトリアキソン (CRO)、セフトチオフル (CTF)、セフポドキシム (CPFX)、エンロフロキサシン (ERFX)、セファロチン (Cf)、エリスロマイシン (EM)、アモキシシリン/クラブラン酸 (AMC) であった。最小発育阻止濃度 MIC は Etest あるいはマイクロタイタープレート (MP) を用いて決定した。家畜由来株には DSM、OTC が用いられた。
- 2) ファージ型別：英国 HPA より分与された型別用ファージを使用して標準法に従って型別を行った。
- 3) パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE)：米国疾病管理センター (CDC) により推奨されているパルスネットプロトコールに準じて実施した。MLVA (multilocus variable number-tandem repeat analysis)：Lindstedt ら (2003)、Liu ら (2003)、Ramisee ら (2004) の方法を参考に行った。
- 4) 薬剤耐性遺伝子の解析：薬剤耐性パターンから推測された遺伝子に関して、既報の類似耐性遺伝子の配列からプライ

マーを設計し、PCRによるDNAの増幅を行った。定法のアガロースゲル電気泳動によってDNA増幅を確認した後、Dye-terminator法によって塩基配列の決定を行った。得られた配列に対してBlast等を用いて相同性検索を行った。

5) キノロン系薬剤耐性化機構の解析：トポイソメラーゼ遺伝子 (*gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*) の Quinolone Resistance Determining Region (QRDR) をPCR増幅し、その塩基配列をダイレクトシーケンシング法により決定した。これによりナリジクス酸耐性を引き起こしたトポイソメラーゼのアミノ酸置換部位を特定した。

6) 家畜由来株および患者由来株の耐性遺伝子について、遺伝学および分子生物学的手法を用い詳細に解析を加え、由来株による差異を検討する。耐性遺伝子を含む領域の全塩基配列を調べると同時に、それらがトランスポゾンあるいはインテグロン等の“動く遺伝子”であるのかどうか、および耐性遺伝子の生成過程を解析する。

C. 研究結果概要

I. サルモネラの疫学、解析

1) 家畜、動物由来：

a) 2007年家畜由来サルモネラの薬剤感受性状況

牛、豚、鶏の健康動物および病畜の便から分離されたサルモネラでは血清型に違いがあった。健康家畜由来株では *S. Infantis* が約半数以上を占めた。一方、病畜由来株の血清型は、*S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Choleraesuis* の順であった。健康動物由来株、病畜由来株とも、D

SM及びOTCに対する耐性率は60%以上を示し、KM及びTMPに対する耐性率は約20-30%であった。一方、病畜由来株から、C EZ耐性が13株(7.6%, 牛由来Typhimurium 4株、牛由来Senftenberg 9株)及びERFX耐性が1株(0.6%, 牛由来Typhimurium)で認められた。

b) 牛由来フルオロキノロン耐性 *S. Typhimurium*

ERFX耐性 *S. Typhimurium* (NA (256 µg/ml) 及びERFX (16 µg/ml)) が2005年に血便を呈し死亡した牛から分離された。GyrA(S83F, D87N)とParC(S80R)のキノロン耐性決定領域(QRDR)に変異が認められた。

2006-2007年に上記同一農場の異なる牛の下痢便から分離されたERFX耐性 *S. Typhimurium* は、NA (32 µg/ml) 及びERFX (4 µg/ml) 耐性で、*qnrS1* を保有していた。

2002-2007年に分離された *S. Typhimurium* 237株では、*qnrS* 遺伝子の陽性率は0.8%であった。

c) イヌおよびネコ由来サルモネラ

動物指導センターに収容された健康なイヌ244頭、ネコ63頭の便から、イヌでは0.4%に、ネコでは6.3%からサルモネラが分離された。血清型はイヌ由来株では *S. Infantis*、ネコ由来株は *S. Nagoya* が2株、*S. Minnesota* が1株、*S. Infantis* が1株であった。そのうち耐性株は、ネコ由来 *S. Minnesota* (SM・TC・KM・ABPC耐性) 及び *S. Infantis* (SM・TC・KM・ST耐性) が4剤耐性株であった。

2) 食品由来：

a) 食肉由来菌株：

国産鶏肉（201 検体、大阪地区）では 54.2%からサルモネラが分離された。その中で *S. Infantis* が 68.6%と最も多かった。埼玉県内の調査ではミンチ肉の 7.5%（3 検体）からサルモネラが分離され、*S. Infantis*（2 検体）と *S. Typhimurium*（1 検体）であった。

b) CPDX 耐性菌

大阪地区での鶏肉分離のサルモネラの薬剤感受性試験結果は 125 株（95.4%）が耐性菌であった。その中で CPDX 耐性菌が国内産鶏肉由来で 15 株（12.1%）あり、その内訳は、ESBL 産生株が *S. Infantis* 6 株（耐性遺伝子型 CTX-M-2、CTX-M-14、TEM-52、SHV-5-2a）、*S. Manhattan* 1 株（TEM-52）および *S. Typhimurium* 1 株（CTX-M-2）、また AmpC 型β-ラクタマーゼ産生株が 7 株、すべて *S. Infantis*（CMY-2）であった。NA 耐性菌は国産鶏肉 18 株（14.5%）、外国産合鴨肉で 1 株認められた。CPFX 耐性株は分離されなかった。

3) 患者由来：

a) 国内発生ヒト由来菌株（フルオロキノロン耐性、CTX 耐性株の存在）

大阪地区患者由来サルモネラ 81 株は 17 の血清型に型別され、*S. Enteritidis* が最も多い血清型であった。NA 耐性菌は患者で 3 事例（14.3%）、保菌者で 5 株（19.2%）認められた。CPDX 耐性の *S. Infantis* が保菌者由来株で 1 株あり、AmpC 型β-ラクタマーゼ産生、*bla*CMY-2 保有株であった。

埼玉県内で 2008 年に、散発下痢症患者及び食品従事者の検便などにおいて健康者から分離されたサルモネラ 146 株は 32

血清型に型別され、最も多く分離されたのは、*S. Typhimurium* が 19 株、次いで *S. Enteritidis* が 17 株、*S. Saintpaul* が 11 株の順であった。この 146 株のうち 56 株（38.4%）が 12 薬剤のいずれかに耐性を示した。最も多く分離された *S. Typhimurium* では 19 株のうち 10 株（52.6%）が耐性を示し、1 株はフルオロキノロン耐性であった。*S. Enteritidis* では 17 株のうち 9 株（52.9%）が耐性を示し、SM 単剤耐性が 8 株と最も多かった。2003 年から 2007 年まで連続して検出されている CPFX や NFLX などフルオロキノロン剤に耐性を示す株が 5 株分離された。それらはフェージ型 193 で、キノロン耐性決定領域（Quinolone resistance determineing region : QRDR）のアミノ酸置換においても、*gyrA* で 2 つのコドン（83 位の Ser、87 位の Asp が Phe、Asn）の置換が認められた。第 3 世代セフェム系薬剤である CTX 耐性株（*bla* CTX-M-14 と *bla* TEM-1 遺伝子を持つ ESBL 産生菌）が 1 株分離された。

b) 海外渡航者下痢症患者由来菌株：

関西空港検疫所で 2001 年 1 月～2007 年 3 月に分離したサルモネラ 302 株から NA 耐性(R)が 76 株、中間(I)が 14 株認められた。高度 CPFX 耐性 2 株の QRDR の変異は、2001 年分離の *S. Schwarzengrund* では *gyrA* 遺伝子の 83 位の Ser が Phe、87 位の Asp が Gly に、*parC* 遺伝子の 80 位の Ser が Arg に変異していた。2004 年分離の *S. Singapore* では *gyrA* 遺伝子の 83 位の Ser が Phe、87 位の Asp が Asn に変異していた。CPFX の MIC が 0.25 ～

2.0 µg/mL の中間(I)を示した 25 株は、21 株が *qnrS1* で、4 株が *qnrS2* であった。QRDR の変異は全てで認められなかった。*qnrS1* 保有株は *S. Corvallis* 17 株、*S. Typhimurium* 2 株、*S. Braenderup* 1 株、*S. Montevideo* 1 株であった。*qnrS2* 保有株は *S. Agona* 1 株、*S. Alachua* 1 株、*S. Braenderup* 2 株であった。

4) *S. Typhimurium* フルオロキノロン (FQ) 耐性株の MLVA 解析 :

これまでに分離されたフルオロキノロン (FQ) 耐性 *S. Typhimurium* に関し、他の ST 株と併せて MLVA を行った。解析の結果、グループの 1 つとして流行性の多剤耐性 DT104 があるが、FQ 耐性株 (ヒト由来および動物由来) はそれとは異なり、ユニークなグループを形成した。FQ 耐性株は同一クローン由来が伝播していると考えられた。

5) 牛由来セファロスポリン耐性 *S. Typhimurium* の解析

今回分離された牛由来 *Salmonella Typhimurium* セファロスポリン耐性を規定する AmpC 型 β ラクタマーゼ遺伝子 (*bla_{CM-2}*) が染色体上に 1 コピー存在することを明らかにした。*bla_{CM-2}* を含む IncA/C プラスミドの一部が染色体に挿入された株である可能性を示唆するデータが得られた。

II. カンピロバクターの疫学

1) 健康な家畜の糞便から分離したカンピロバクター

2006-2007 年度に全国の家畜保健衛生所で健康な家畜の糞便から分離したカンピロバクター 306 株 (牛 31 株、豚 92 株、

採卵鶏 92 株、肉用鶏 91 株) を用いた。ERFX に対する耐性は、*C. jejuni* (H18, H19: 37.5%, 25.8%) 及び *C. coli* (30.2%, 53.8%) で認められた。人のカンピロバクター症の第一次選択薬である EM に対する耐性は、*C. coli* の約 30% で認められたが、*C. jejuni* には全く認められなかった。ABPC 耐性 *C. jejuni* 42 株中 40 株が *bla_{OXA61}* を保有していた。

2) 国産鶏肉由来菌株 :

大阪府で流通している国産鶏肉 201 検体を検査し 84 検体 (41.8%) からカンピロバクターが分離された。*C. jejuni* では 79 株中 21 株 (26.6%) がキノロン耐性であった。

3) 患者由来株 :

東京都内散发下痢症患者由来 *C. jejuni* 182 株ではキノロン系薬剤耐性株が 49 株 (26.9%)、TC 耐性が 37 株 (20.3%)、感受性株 96 株 (52.7%) であった。一方 *C. coli* では 13 株中 11 株 (84.6%) がいずれかの薬剤に耐性を示す株であった。キノロン系薬剤耐性株は 8 株 (61.5%) であった。

III. 腸管出血性大腸菌の解析

埼玉県内で 2008 年に、分離された 104 株 {0157:H7 (VT1&2 産生) が 37 株、次いで 0157:H7 (VT2 産生) の 29 株} の耐性率は 28.8% であった。最も多かったのは SM・TC・ABPC 耐性で 12 株、次いで SM・ABPC・ST 耐性が 5 株分離された。今回はフルオロキノロン剤や第 3, 第 4 世代セフェム系薬剤に対する耐性菌は検出されなかった。

IV. MRSA の検出

2008年に大阪府内で流通している食肉392検体から分離した4株を供試した。国内産鶏肉、国内産豚肉、国内産牛肉、外国産合鴨それぞれ1検体からMRSAを検出した。検出率は1.0%であった。4株のオキサシリンのMICは4 μ g/mL以上であり、*mecA*遺伝子を保有していた。

東京都で食中毒関連検体から分離された370株の黄色ブドウ球菌についてMRSAスクリーン培地上での発育を調べた結果、3株(0.8%)がMRSAであると推定された。MRSAが検出された食品は、鶏もも肉(参考品)、豚バラ肉(参考品)および焼き鮭(残品)であった。分離されたMRSA 3株は全て*mecA*遺伝子を保有しており、コアグラゼⅢ型、エンテロトキシンC産生株であった。

V. ペット由来大腸菌の調査

1) 犬由来:

北海道地区で犬から34株のFQ耐性大腸菌(分離率は、17.0%)が分離された。QRDRのアミノ酸置換が認められた。犬由来株の0群型は01が12株(35.3%)、人由来株では025が44株(37.3%)とそれぞれ最も多く認められた。また、両由来株とも全体の50%以上が型別不能であった。犬および人両由来株で共通の血清型であった01の17株(犬由来株12株および人由来株5株)と、0153の3株(犬由来株1株および人由来株2株)の計20株についてPFGE遺伝型別解析を行った。犬由来株においては、異なる患犬由来株でそれぞれ97%以上の相同率を示した株が認められた。しかし、犬由来株と人由来

株間で95%以上の高い相同率を示す株は認められなかった。

2) ペットからの食中毒菌分離と薬剤感受性調査

2005年4月から2007年3月までに東京地区にて、二次診療を受診した犬、猫、小鳥、エキゾチックアニマルなどの症例のうち、910症例(2005年度581症例、2006年度329症例)が細菌感染症と診断され、このうち58症例(6.4%)で起原菌として大腸菌が分離同定された。

分離された大腸菌59株のうち48株(81.4%)が何らかの薬剤に耐性を示した。このうち33株(55.9%)は3剤以上に耐性を示す多剤耐性菌であった。耐性菌の出現が特に問題視される第3世代セファロスポリン、CTFとFQ系薬剤、ERFXの耐性率は、それぞれ39.0%及び54.2%であった。ERFXに対するMICが512 μ g/mlまたは512 μ g/mlを示した5株のトポイソメラーゼにおけるアミノ酸置換部位の同定を試みたところ、全ての株でGyrAの2カ所(Ser83 \rightarrow Leu, Asp87 \rightarrow Asn)及びParCの1カ所(Ser80 \rightarrow Ile)に同じ変異が認められた。加えて、4株ではParCの他の部位に1カ所変異が認められたが、変異のパターンは3つ存在した。

D. 考察

サルモネラ感染症は小児や高齢者には全身感染症として時に致死的になる。その治療に使われる薬剤はフルオロキノロン系及び第3、4世代セファロスポリン系の薬剤であり、これらに耐性の菌による感染の場合には治療に抵抗性になることが危惧されている。そのためWHO等はそ

これらの耐性菌の出現およびその拡散を防ぐ手段を世界的に画策している。わが国においても、耐性菌の獲得状況を把握するために、農場の家畜から分離される菌の耐性状況から、食肉および下痢患者からの分離菌の耐性状況までを横断的に把握できるサーベイランス体制の確立を図ってきている。今回の班研究においてそのサーベイランス体制が軌道に乗り出し、いくつかの重要な所見が明らかになってきた。家畜由来のサルモネラにおいても、フルオロキノロン耐性とセファロスポリン耐性が2000年初めから継続的に分離されている。これまでの調査で、フルオロキノロン耐性は、2001年に病豚由来 *S. Choleraesuis* で認められたが、2005年に以降に病牛由来 *S. Typhimurium* で毎年確認されている。2005～2007年に分離された *S. Typhimurium*3株の耐性機構を調べたところ、DNA gyrase に変異のある高度耐性株および *qnrS1* 遺伝子をプラスミドにもつ低度耐性株によるものが分離されている。今回の調査では限定された農場での浸潤の可能性が示唆されたが、今後これらの拡大が起こるのかのさらなる調査が必要である。特に *qnrS* は一般にプラスミド上に局在することから、他のサルモネラの血清型や他菌種への浸潤が起こるかの調査が必要である。

セファロスポリン耐性サルモネラは、2006年以降、牛及び肉用鶏由来 Newport、Typhimurium、Infantis、Senftenberg など多様な血清型で認められている。これまで、健康家畜由来大腸菌においても、肉用鶏由来株を中心に全ての畜種で認められていることから、国内の家畜間に広

く浸潤していることが推察される。今後、家畜由来株の性状解析を進めるとともに、家畜・食品・人症例由来株の関連を検討するために有用な疫学マーカーを利用したデータベースの構築が必要である。

カンピロバクターもフルオロキノロン耐性菌が世界的に問題となっている。注目すべき点は、健康家畜由来カンピロバクターの薬剤感受性の動向として、2000～2003年に比べて2006～2007年においてERFX耐性が、*C. jejuni* と *C. coli* ともに増加傾向にあるということである。その原因に関して特に薬剤使用量との関連性の究明が重要である。

近年食肉等に含まれる MRSA の人への感染が注目されだした。そこで、我が国の市販食肉および食中毒関連食品中の MRSA 汚染を調べた結果、市販食肉（豚肉および牛肉）および食中毒関連食品（鶏もも肉、豚バラ肉、焼き鮭）から0.8～1.0%と僅かではあるが MRSA が検出された。食中毒関連検体の鶏もも肉および豚バラ肉は、同じ焼肉店から収去されたものであるため、施設内で同一汚染源から汚染した可能性も考えられる。それら分離された MRSA のコアグラマーゼ型はⅢ型、エンテロトキシンC産生性であった。小児科受診患者から分離された MRSA で最も多く分離される性状はコアグラマーゼⅡ型、エンテロトキシンC+T産生性の株である。またコアグラマーゼⅢ型ではエンテロトキシンC+T産生株が多く分離されている。食品から分離される株と患者から分離される株との直接的な因果関係は今回の調査では見出されていないが、今後、さらに食品中の汚染状況を把握すると共

に、ヒト由来株との比較を行っていく必要がある。

本研究から伴侶動物である犬が人医療で重要といわれるフルオロキノロン系薬に対して耐性を示す大腸菌を高率に保菌している実態が明らかとなった。それら大腸菌は PFGE 解析により、同じ動物病院において異なる犬から同じ遺伝子型の耐性菌が分離されており、動物病院内での循環の可能性が示唆された。また、犬から分離されたフルオロキノロン耐性大腸菌と、犬が飼育された同じ地域の医療施設の臨床材料から分離した人由来フルオロキノロン耐性大腸菌の各種性状を比較したところ、両由来株でフルオロキノロン抗菌剤に対する薬剤感受性に相違は無かったが、耐性に関与する DNA ジャイレースの QRDR のアミノ酸置換部位に違いがあることや分離菌の O 群血清型が異なること、さらには分離菌の PFGE 型が異なることを考えると、犬から人へフルオロキノロン耐性大腸菌が伝播する可能性は低いものと考えられた。

E. 結論

家畜に分布するサルモネラとカンピロバクターの薬剤感受性状況を調査した結果、医療上重要なフルオロキノロン剤やセファロスポリンに対する耐性が増加している傾向が認められた。特にセファロスポリン耐性遺伝子はヒトの下痢症の原因サルモネラの多くの血清型に浸透してきている。市販食肉および食中毒関連食品中の MRSA 汚染を調べた結果、1%前後に分離が見られたが、人から分離される菌との明らかな相関は現在のところ認め

られていない。愛玩動物、特に犬におけるフルオロキノロン耐性大腸菌の保菌状況を調査したところ、17.0%から耐性菌が分離され、蔓延していることが明らかとなった。しかし、現在のところ犬由来耐性菌が人へ伝播している証拠は見出されていない。

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

G. 健康危害情報

家畜に分布するサルモネラとカンピロバクターにおいて医療上重要なフルオロキノロン剤やセファロスポリン系薬剤に対する耐性が増加している傾向が認められた。治療に抵抗する事例もあるので、臨床的に注意を喚起する必要がある。今後の耐性菌の動向とその拡散を調査し、そのデータを公表していく必要がある。

H. 研究発表

(1) 論文発表

1. Asai, T., Harada, K., Kojima, A., Sameshima, T., Takahashi, T., Akiba, M., Nakazawa, M., Izumiya, H., Terajima, J., Watanabe, H. 2008. Phage type and antimicrobial susceptibility of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis from food-producing animals between 1976 and 2004. *New Microbiologica* 31: 557-561.
2. Harada, K., Ozawa, M., Ishihara, K., Koike, R., Asai, T. and Ishikawa, H. 2009. Prevalence of

- antimicrobial resistance among serotypes of *Campylobacter jejuni* isolates from cattle and poultry in Japan. *Microbiol Immunol.* (in press)
3. Asai, T., Murakami, K., Ozawa, M., Koike, R., Ishikawa, H. 2009. Relationship of Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Schwarzengrund between broiler chickens and retail chicken meats in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* (in press)
 4. Y. Une, A. Sanbe, S. Suzuki, T. Niwa, K. Kawakami, R. Kurosawa, H. Izumiya, H. Watanabe, and Y. Kato: *Salmonella enterica* serotype Typhimurium infection causing mortality in Eurasian tree sparrows (*Passer montanus*) in Hokkaido. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 61, 166-167, 2008.
 5. Kojima A., Morioka A., Kijima M., Ishihara K., Asai T., Fujisawa T., Tamura Y. and Takahashi T.: Classification and Antimicrobial Susceptibilities of Enterococcus species isolated from Apparently Healthy Food-producing animals in Japan, *Zoonese and Public Health* (印刷中)
 6. M. Akiba, T. Sameshima, I. Uchida, M. Nakazawa: Antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated from cattle in Japan. *Food Additives and Contaminants.* 25, 1076-1079, 2008.
 7. M. Sugawara, D. Fukamizu, H. Okazaki, K. Tanaka, I. Uchida, H. Izumiya, H. Watanabe, M. Kusumoto, T. Iwata, M. Akiba: Chromosomal location of *bla_{CMY-2}* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and its contribution to cephalosporin resistance. 2009. Submitted for publication.
 8. Igimi S., Okada Y., Ishiwa A., Yamasaki M., Morisaki N., Kubo Y., Asakura H. and Yamamoto S. (2008) Antimicrobial resistance of *Campylobacter*: Prevalence and trends in Japan. *Food Addit Contam.* 25(9):1080-1083.
 9. 泉谷秀昌:サルモネラ食中毒。化学療法の領域、第24巻第7号、1009-1015、20年7月。
 10. 秋庭正人:動物に対するキノロン系抗菌剤の使用と耐性菌選択との関連。動物用抗菌剤研究会報、30、29-33、2008。
 11. 秋庭正人:わが国の牛群における *Salmonella* Dublin 薬剤感受性の変化。畜産技術、643、6-10、2008。
- (2) 口頭発表
1. H. Izumiya, J. Terajima, and Haruo Watanabe: Fluoroquinolone-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in Japan. 48th Annual ICAAC/ISDA 46th Annual Meeting, Oct. 2008, Washington, DC, USA.
 2. 田村 豊, 村松康和, 中島千絵, 柳

- 沢千恵, 鈴木定彦, 花木秀明: 動物病院におけるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の伝播, 第 82 回日本感染症学会総会, 2008 年 4 月 17 日, 松江.
3. 下久保奈津美, 廉澤 剛, 石原加奈子, 村松康和, 上野弘志, 田村 豊: 動物病院におけるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌対策の有効性, 第 146 回日本獣医学会学術集会, 2008 年 9 月 24-26 日, 宮崎.
 4. 佐藤豊孝, 石原加奈子, 村松康和, 上野弘志, 岡林環樹, 横田伸一, 藤井暢弘, 田村 豊: 犬由来大腸菌のフルオロキノロン耐性機構, 第 146 回日本獣医学会学術集会, 2008 年 9 月 24-26 日, 宮崎.
 5. 田口真澄, 河原隆二, 勢戸和子, 井上 清, 林 昭宏, 山形晃明, 鎌倉和政, 柏樹悦郎: 海外旅行者下痢症患者から分離したサルモネラの血清型と薬剤耐性, 第 48 回感染性腸炎研究会総会, 2009 年 3 月, 東京
 6. 菅原克, 深水大, 岡崎ひづる, 石岡幸子, 岩田剛敏, 内田郁夫, 秋庭正人: 国内の牛から分離されたセファロスポリン耐性サルモネラにおける *bla_{CM-2}* 遺伝子の存在様式. 第 146 回日本獣医学会学術集会, 2008 年 9 月 25 日, 宮崎.
 7. 秋庭正人: 家畜・家禽のサルモネラ感染症の動向と薬剤耐性株の分離. 第 82 回日本細菌学会総会, 2009 年 3 月 12 日, 名古屋.
 8. 石和玲子「鶏および牛由来カンピロバクター分離株の抗生物質耐性獲得状況について」第 24 回日本環境感染症学会総会シンポジウム, 2009/2/28

平成 20 年度 厚生労働省 食品の安心・安全確保推進研究事業
「薬剤耐性食中毒菌サーベイランスに関する研究」

分担研究報告書

分担課題名:サルモネラをはじめとした食中毒菌の薬剤耐性に関する遺伝学的研究

研究分担者 泉谷秀昌 国立感染症研究所 細菌第一部
研究協力者 寺嶋淳 国立感染症研究所 細菌第一部
研究協力者 松本裕子 横浜市衛生研究所

研究要旨:本研究班では、ヒトの健康への脅威となる食品由来細菌感染症に関して、主として薬剤耐性に着目し、薬剤耐性食中毒菌による健康被害の発生動向を把握するための監視体制に関して、ヒト、食品、環境および家畜といった多方面からの情報整備をすることを目的とする。本分担研究においては、特に、細菌性食中毒の原因物質の第 1 に挙げられるサルモネラをはじめ、食品汚染を介した細菌感染症に着目して発生動向の解析を行う。

A. 研究目的

2007 年厚生労働省食中毒統計における細菌性食中毒の患者総数は 12,964 名であった。このうち、28%にあたる 3,603 名がサルモネラによるものであり、本菌の公衆衛生上の重要性を示している。サルモネラには約 2,500 種の血清型が含まれるが、中でも *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*, 以下 SE) による患者数は 1990 年代に急増し、現在も

なお血清型別での検出頻度で第一位を占めている。同じく *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*, 以下 ST) は、SE が台頭してくる以前は血清型別で最も多く検出されていた。ST は現在でもなお、血清型別検出頻度の上位を占めている。

食中毒細菌における菌株の耐性化の傾向は異なっており、SE における耐性株の報告は少ないものの、ST においては

多剤耐性化が顕著であると言われている。

本研究では、これら食中毒細菌の耐性化の動向を調査するとともに、耐性因子等について遺伝学的解析を行うことで、耐性機構の解明および耐性化の広がり状況を明らかにすることを目指す。

(倫理面への配慮)

食中毒事例に関し、ヒトの臨床情報等を扱う場合には、事前に研究倫理委員会の承認を得た上で、個人情報の取り扱いに注意し、研究を遂行する。分離した菌株に関しては、匿名化を図り、特定の個人に不利益が生じないように配慮する。

B. 研究方法

1. 供試菌株: 全国の地方衛生研究所等および動物医薬品検査所等の協力により得られたサルモネラ分離株を使用した。

2. 薬剤感受性試験: BBL 社のセンシディスクを用いて、CLSI に準拠した方法により試験し耐性を決定した。使用した薬剤はアンピシリン(A)、ストレプトマイシン(S)、テトラサイクリン(T)、シプロフロキサシン(Cip)、カナマイシン(K)、セフォタキ

シム(Ct)、クロラムフェニコール(C)、ST合剤(Sx)、ゲンタマイシン(G)、ナリジクス酸(N)、サルファ剤(Su)、ホスホマイシン(F)の 12 剤であった(場合によってセファロチン(Cf)も使用)。最小発育阻止濃度 MIC は Etest を用いて決定した。

3. パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE): 米国疾病管理センター(CDC)により推奨されているパルスネットプロトコールに準じて実施した。

4. MLVA (multilocus variable number-tandem repeat analysis) : Lindstedt ら(2003)、Liu ら(2003)、Ramisee ら(2004)の方法を参考に行った。

5. 薬剤耐性遺伝子の解析: 薬剤耐性パターンから推測された遺伝子に関して、既報の類似耐性遺伝子の配列からプライマーを設計し、PCRによるDNAの増幅を行った。定法のアガロースゲル電気泳動によって DNA 増幅を確認した後、Dye-terminator 法によって塩基配列の決定を行った。得られた配列に対して Blast 等を用いて相同性検索を行った。

6. レプリコンタイピング: Carattoli ら(2005)の方法に従って行った。各レプリコンに対する TaqMan プローブを作成し、リアルタイム PCR 法の検討も行った。

C. 研究結果および考察

1. レプリコンタイピングの検討

耐性サルモネラ、特にセフェム系抗菌薬耐性株についてはプラスミドとの関連性が指摘されている。近年プラスミドの型別の一つとして PCR をベースとしたレプリコンタイピングが発表された。そこで、これまでに収集した耐性株を供試菌株として同法の検討を行った。

同法は 18 種類のレプリコンの DNA 領域を 8 本のマルチプレックス PCR を用いて検出する方法である(表 1)が、図 1 に示すように非特異的 PCR 産物が観察されることもあったため、特異性を高めるため、TaqMan プローブを併用したリアルタイム PCR の検討を行い、概ね良好なシグナルを得ることができた。

これを用いてセフェム系抗菌薬耐性株を試験した。*S. Infantis* (以下 SI)、*S. Manhattan*、ST それぞれ 27 株、1 株、5 株についての結果は表 2 のようであった。試験した 33 株中 16 株において何らかのレプリコンが検出された。*bla*CMY-2 遺伝子保有株において報告のある *IncA/C* も今回の株に含まれていることが明らかとなった。今後、これらの菌株についてプラスミドプロファイル、伝達性試験等の詳

細な解析を行い、その結果とあわせて本タイピングシステムを更に検討していく必要があるものの、本法が、耐性菌を型別する上で、また、耐性機構を解明する上で有用な指標となりうることを示された。

2. ヒト、食品、動物(家畜)由来株の遺伝子型別による比較

本研究班で収集した SI のヒト由来株、食品由来株、動物(家畜)由来株について、PFGE による遺伝子型別を行った(図 2)。一部にヒト由来株あるいは動物由来株が多く占めるクラスターが観察されたが、全体的には、由来によらず種々の株が混在した形でクラスターが形成された。また、セフェム系抗菌薬耐性株についても同様に、特定の菌株グループが耐性を獲得しているのではなく、遺伝子型によらずに耐性菌が分布している状況が明らかとなった。ヒト由来のセフェム系抗菌薬耐性株は 1 株だけ(*bla*TEM-20 保有)であったが、他の菌株との違いはなく、汚染食品の喫食が患者発生につながる状況にあることが示唆された。

3. ST 耐性株の MLVA

これまでに分離されたフルオロキノロン(FQ)耐性 ST に関し、他の ST 株と併せ

て MLVA を行った (図 3)。FQ 耐性供試菌株にはヒト由来株および動物由来株が含まれる。解析の結果観察された大きなグループの 1 つとして流行性の多剤耐性 DT104 があるが、FQ 耐性株はそれとは異なり、なおかつ比較的ユニークなグループを形成することが明らかとなった。FQ 耐性は *gyrA*、*parC*、*parE* などの染色体性遺伝子に依存するためかもしれないが、SI のセフェム系抗菌薬耐性株が他の株と混在した形で型別されるのと対照的な結果が得られた。

プラスミドによる耐性獲得状況をサーベイするための手法の一つとしてレプリコンタイピングが有効であることが示唆された。

SI においてはセフェム系抗菌薬耐性株が食品、動物由来株を中心に分離されており、これらはヒト由来株と遺伝子型別上の違いがほとんどないと考えられ、今後ヒトへの感染拡大が懸念される。

FQ 耐性 ST は、ST の中でも独自のグループを形成しうることが遺伝子型別から示唆された。

今後、こうした耐性菌のさらなる解析、ならびに動向の変化に注意が必要である。

D. 結論

細菌感染症において菌の耐性化は、非常に重要な問題である。サルモネラ感染症は家畜等の動物およびそこから派生する食品から由来する感染症の代表的なものである。両者の耐性菌の出現状況ならびにその遺伝学的背景の知見についてより広い材料を対象にサーベイランスを行うことの重要性が改めて示唆された。

E. 健康危険情報

セフェム系抗菌薬もしくはフルオロキノロン系抗菌薬耐性サルモネラが、ヒト、食品、家畜において同定されており、こうした菌株の発生動向ならびにさらなる耐性の獲得状況に関する注意が必要である。

F. 研究発表等

(1) Y. Une, A. Sanbe, S. Suzuki, T. Niwa, K. Kawakami, R. Kurosawa, H. Izumiya, H. Watanabe, and Y. Kato: *Salmonella enterica* serotype Typhimurium infection causing mortality in Eurasian tree sparrows (*Passer montanus*) in Hokkaido. Jpn. J. Infect.

Dis., 61, 166-167, 2008.

(2) T. Asai, K. Harada, A. Kojima, T. Sameshima, T. Takahashi, M. Akiba, M. Nakazawa, H. Izumiya, J. Terajima, and H. Watanabe: Phage type and antimicrobial susceptibility of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis from food-producing animals in Japan between 1976-2004. *New Microbiol.* 31, 555-559, 2008.

(3) 泉谷秀昌:サルモネラ食中毒。化学療法の領域、第24巻第7号、1009-1015、2008年7月。

(4) H. Izumiya, J. Terajima, and Haruo Watanabe: Fluoroquinolone-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in Japan. 48th Annual ICAAC/ISDA 46th Annual Meeting, Oct. 2008, Washington, DC, USA.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

※解析に使用した菌株を提供していただいた全国の地方衛生研究所、動物医薬品検査所、動物衛生研究所等の諸先生方に深謝いたします。

¹ HI1 471	HI2 644	I1 139	² X 376	L/M 785	N 559
³ FIA 462	FIB 702	W 242	⁴ Y 765	P 534	FIC 262
⁵ A/C 465	T 750	FIIAs 270	⁶ F _{repB} 270	⁷ K 160	⁸ B/O 159

表 1. レプリコンタイピングで検出される inc グループ。下段は増幅産物の大きさ (JMM, 63, 219-228, 2005.)。左上の数字はマルチプレックス PCR の組み合わせを示す。

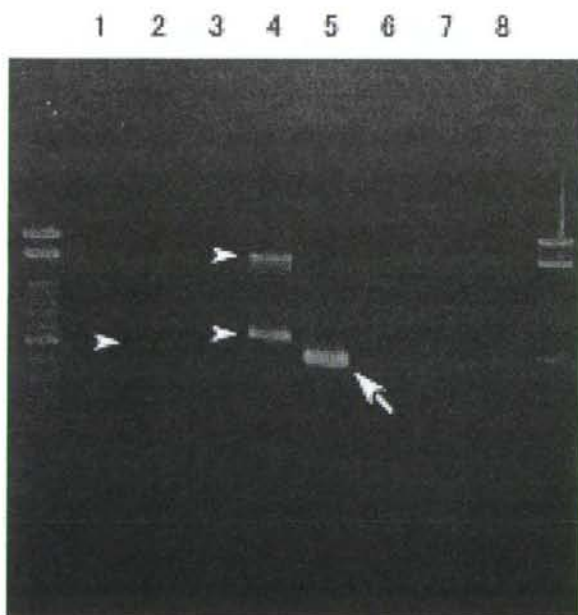


図 1. レプリコンタイピング例 (PCR)。レーン は表 1 の組み合わせ。矢頭、非特異的と考えられるバンド。矢印: 特異的と考えられるバンド (incA/C)。

耐性遺伝子 (<i>bla</i>)	レプリコン	血清型			総計
		Infantis	Manhattan	Typhimurium	
CMY-2	-	12			12
	A/C	4			4
	FIA+FIB+A/C			1	1
	A/C+FIIs			1	1
	I1	2			2
	I1+FIIs			1	1
	FIB+I1+FIIs			1	1
	FIB+A/C+FIIs			1	1
CTX-M-14	FrepB	2			2
	FrepB+B/O	1			1
CTX-M-2	N	1	1		2
CTX-M-3	-	1			1
TEM-20v	-	1			1
TEM-52	-	2			2
TEM-52c	-	1			1
総計		27	1	5	33

表 2. セフェム系抗菌薬耐性サルモネラを用いたレプリコンタイピング。

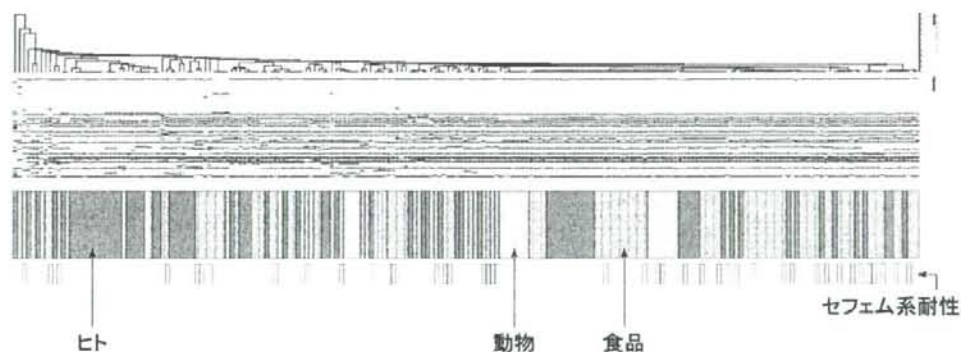


図 2. *S. Infantis* の PFGE 解析。使用制限酵素は *Xba*I。